

B7

Use of imexon as immunosuppressant

Patent Number: DE3844655

Publication date: 1990-05-17

Inventor(s): BICKER UWE PROF (DE); BOSIES ELMAR DR PHIL (DE); HAAG RAINER DIPL CHEM DR RER N (DE); HERRMANN DIETER DR MED (DE); KAMPE WOLFGANG DR RER NAT (DE)

Applicant(s): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH (DE)

Requested Patent: ☐ DE3844655

Application Number: DE19883844655 19880728

Priority Number (s): DE19883844655 19880728; DE19883825667 19880728

IPC Classification: A61K31/495; A61K31/70

EC Classification: A61K31/415, A61K31/70C

Equivalents:

Abstract

The present invention relates to the use of 4-imino-1,3-diazabicyclo[3.1.0]hexan-2-one (imexon) for the prophylaxis or treatment of viral or retroviral infections, in particular of AIDS or ARC (AIDS related complex). The invention also relates to novel pharmaceutical compositions containing imexon in combination with other agents with antiretroviral activity.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

①2 **Offenlegungsschrift**
①1 **DE 3844655 A 1**

⑤1 Int. Cl. 5:
A 61 K 31/495
A 61 K 31/70

②1 Aktenzeichen: P 38 44 655.3
②2 Anmeldetag: 28. 7. 88
④3 Offenlegungstag: 17. 5. 90

DE 3844655 A 1

⑦1 Anmelder:
Boehringer Mannheim GmbH, 6800 Mannheim, DE

⑥2 Teil aus: P 38 25 667.3

⑦2 Erfinder:
Bicker, Uwe, Prof., 6140 Bensheim, DE; Bosies,
Elmar, Dr.phil.nat., 6940 Weinheim, DE; Haag,
Rainer, Dipl.-Chem., Dr.rer.nat., 6800 Mannheim, DE;
Herrmann, Dieter, Dr.med., 6900 Heidelberg, DE;
Kampe, Wolfgang, Dr.rer.nat., 6805 Heddesheim, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Verwendung von Imexon als Immunsuppressivum

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die neue Verwendung von 4-Imino-1,3-diazabicyclo-(3.1.0)-hexan-2-on (Imexon) zur Prophylaxe oder Behandlung von viralen oder retroviralen Infektionen, insbesondere von AIDS oder ARC (AIDS related complex). Ferner sind Gegenstand der Erfindung neue Arzneimittel, enthaltend Imexon in Kombination mit anderen antiretroviralen aktiven Wirkstoffen.

DE 3844655 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Imexon zur Herstellung von Arzneimitteln mit immunsuppressiver Wirkung.

Insbesondere bezieht sich die Erfindung auf die Verwendung von Imexon zur Herstellung von Arzneimitteln, die bei der Behandlung von solchen Krankheiten eingesetzt werden, bei denen eine pathophysiologisch erhöhte B-Lymphozyten-Proliferation oder B-Lymphozyten-Aktivierung zu beobachten ist. Als Krankheiten in diesem Sinne kommen beispielsweise Autoimmunerkrankungen, B-Zell- oder Plasmazell-Neoplasien, lymphoblastische Lymphome, Abstoßungsreaktionen nach Gewebe- oder Organtransplantationen oder virale Infekte in Frage.

Außerdem sind Gegenstand der vorliegenden Erfindung Arzneimittel, die als Kombinationspräparate den Wirkstoff Imexon und ein weiteres immunsuppressiv wirksames Chemotherapeutikum oder ein Zytostatikum enthalten.

Die systematische Bezeichnung von Imexon, dessen Strukturformel in Abb. 1 dargestellt ist, lautet 4-Imino-1,3-diazabicyclo-(3.1.0)-hexan-2-on.

Imexon und Verfahren zu dessen Herstellung sind aus US-A 40 83 987 bekannt. Es ist dort als cancerostatisch wirksames Therapeutikum beschrieben, das immunstimulierende Eigenschaften aufweist. Die cancerostatische Wirkung wurde anhand der Hemmung des Tumorwachstums von Walker-Sarkoma 256 nach Applikation von Imexon bei Ratten nachgewiesen. Die immunstimulierende Wirkung ging aus Versuchen hervor, in denen ein Anstieg der Leukozyten sowie ein Anstieg der Zahl der Antikörper bildenden Milzzellen nach Applikation von Imexon beobachtet werden konnte. Die pharmakologische Eigenschaft von Imexon wird gemäß dieser US-Patentschrift darin gesehen, daß Imexon das Wachstum der sich rasch teilenden Krebszellen so stark beeinträchtigt, daß unter Umständen eine Rückbildung der Tumore möglich ist. Gemäß US-A 40 83 987 liegt die vorteilhafte Wirkung von Imexon in der gleichzeitig mit den cancerostatischen Wirkung einhergehenden Stärkung des an sich geschwächten körpereigenen Immunabwehrsystems.

Allgemein sind aus dem Stand der Technik Immunsuppressiva als solche schon seit längerer Zeit bekannt (Pharmazie unserer Zeit 1, 2—8 [1972] und 12, 20—29 [1983]). Der in diesem Zusammenhang verwendete Ausdruck "Immunsuppression" bezeichnet dabei im allgemeinen die unspezifische Unterdrückung der Immunantwort, z. B. mit Hilfe von Antisera, ionisierenden Strahlen oder speziellen Therapeutika.

Diese Chemotherapeutika finden Anwendung nach der Transplantation von Geweben oder Organen und bei der Therapie von Autoimmunerkrankungen. Sie hemmen die Proliferation von Lymphozyten durch direkten oder indirekten Eingriff in die DNA- und RNA-Synthese. In dieser Klasse von Verbindungen gehören Cyclosporine, Folsäure-Antagonisten, Purin-Analoga, alkylierende Substanzen wie Cyclophosphamid und bestimmte Corticosteroide. Der Nachteil dieser bisher eingesetzten Immunsuppressiva ist jedoch die in erhöhtem Maße zu beobachtende Infektionsanfälligkeit des behandelten Organismus, da das gesamte körpereigene Immunsystem geschwächt und sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunantwort unterdrückt werden.

Der bisher aus dem Stand der Technik artifiziell induzierte Immunsuppression konnte auf verschiedene Art und Weise erreicht werden:

durch Verabreichung von Antigenen, Verabreichung von spezifischen Antisera oder Antikörpern, Verwendung von anderen biologischen Reagenzien, wie z. B. Antilymphozyten-Antisera, durch Verwendung von zytotoxischen/zytostatischen/immunsuppressiven Verbindungen, durch Radiation oder durch chirurgische Entfernung von lymphoidem Gewebe.

Die immunsuppressiven Eigenschaften von derzeit bekannten Immunsuppressiva, wie z. B. Zytostatika und Corticosteroide, sind dosisabhängig, aber unselektiv, d. h. sie wirken auf alle immunkompetenten Zellen. Diese Verbindungen hemmen sowohl die humorale als auch zelluläre Immunantwort auf eine Vielzahl von Antigenen und wirken unspezifisch auf T- oder B-Lymphozyten. Auch Cyclosporin A, das z. Z. selektivste Medikament, supprimiert nicht nur die Proliferation von T-Lymphozyten, sondern auch Immunprozesse, die nicht T-Zell-abhängig sind.

Es besteht daher sehr großes Interesse an Immunsuppressiva, die spezifisch mit pathologisch verstärkten bzw. erhöhten Immunmechanismen interferieren, ohne jedoch die im Körper normal ablaufenden natürlichen Immunreaktionen zu beeinflussen. Solche spezifisch wirksamen immunsuppressiven Substanzen sind bis heute nicht bekannt.

Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, ein solches neues immunsuppressiv wirksames Mittel zur Verfügung zu stellen.

Es wurde nun überraschenderweise gefunden, daß Imexon diese Aufgabe löst und als vorteilhaftes Immunsuppressivum eingesetzt werden kann. Es supprimiert spezifisch die B-Zell-Proliferation oder B-Zell-Aktivierung. Es kann vorteilhaft bei der Behandlung von allen Krankheiten eingesetzt werden, bei denen eine polyklonale Aktivierung oder Proliferation von B-Zellen von pathophysiologischer, symptomatischer oder klinischer Relevanz ist.

In diesem Sinne kommt die Behandlung von folgenden Krankheiten in Frage: Autoimmunerkrankungen, wie rheumatoide Arthritis, Diabetes mellitus Typ I, Psoriasis, Lupus Systemicus Erythematosus; Abstoßungsreaktion nach Gewebe oder Organtransplantationen z. B. von Haut, Knochenmark und Nieren, virale oder retrovirale Infektionen jeglicher Genese, wie z. B. ARC (AIDS related complex) und AIDS sowie deren Vorstadien; sowie B-Zell-Leukämien und Lymphome, z. B. chromisch lymphatische Leukämie, lymphoblastische Lymphome (z. B. Burkitt-Lymphom etc.) oder B-Zell-/Plasmazell-Neoplasien, wie z. B. Plasmazytom (multiples Myelom) etc. Als Autoimmunerkrankungen werden in der Literatur im allgemeinen solche Erkrankungen bezeichnet, die mit der Bildung von Autoantikörpern in Verbindung stehen. Diese Autoantikörper richten sich gegen körpereigene Antigene und bewirken somit eine Abwehr gegenüber körpereigenen Stoffen. Diese krankhafte Überreaktion des Immunsystems gilt es, mit spezifisch wirkenden Immunsuppressiva zu unterdrücken.

Außerdem wurde überraschenderweise gefunden, daß Imexon die Proliferation von Lymphozyten dosisabhängig hemmt.

Imexon kann direkt selbst oder in Form seiner pharmakologisch verträglichen Säureadditionssalze eingesetzt werden.

Im Sinne der vorliegenden Erfindung soll der Ausdruck "Immunsuppression" im allgemeinen alle Aspekte der natürlicherweise induzierten immunologischen Nicht-Ansprechbarkeit, der artifiziell induzierten Nicht-Ansprechbarkeit und der pathologisch induzierten Toleranz eines Individuums auf Auto- oder Fremddantigene beinhalten.

Die immunsuppressive Wirkung von Imexon konnte anhand der Hemmung der Proliferation von humanen B-Lymphozyten nachgewiesen werden, wobei die Proliferation experimentiell durch den B-Zellwachstumsfaktor (B-cell-growth factor = BCGF) induziert wird.

Weiterhin konnten die pharmakologischen Eigenschaften von Imexon durch Concanavalin A (ConA)-induzierte Proliferation muriner Splenozyten (LTT), durch Phythamagglutinin (PHA)-induzierte Proliferation humaner Lymphozyten sowie durch den Tumorstachstumshemmungsassay (TGI) charakterisiert werden.

Um ruhende B-Zellen zur Proliferation anzuregen, sind zwei Signale erforderlich. Das erste Signal ist ein Aktivierungssignal, das durch ein Antigen oder anti- μ vermittelt wird. Die Übertragung dieses Aktivierungssignals hat schließlich zur Folge, daß auf der B-Zell-Oberfläche Rezeptoren für den B-cell-growth-factor (BCGF) exprimiert werden. Der BCGF ist ein lösliches, von T-Zellen sezerniertes Lymphokin mit einem Molekulargewicht von 17 000—18 000 D. Die Expression von BCGF-Rezeptoren auf der B-Zelle ermöglicht dieser, auf das Proliferationsignal von BCGF zu antworten. Normalerweise werden B-Zellen durch diese zwei Signalprozesse vom Ruhezustand in die proliferative Phase überführt.

Imexon supprimiert nun diesen Vorgang insofern spezifisch, als die Concanavalin A (ConA)- und Phytohamagglutinin (PHA)-induzierte Lymphozytenproliferation sowie die spontane Proliferation von Methylcholanthren-induzierten Fibrosarkomzellen (MethA) nicht oder nur bei 10—30fachen höheren Konzentrationen beeinflußt werden.

Imexon kann auch als Kombinationspräparat mit anderen Immunsuppressiva, wie z. B. Cyclosporin A, Ciamexon oder Azathioprin sowie antiretroviral aktiven Substanzen, wie z. B. Azidothymidin (AZT) verwendet werden.

Ebenso ist die Kombination von Imexon mit Cytostatika möglich, wie z. B. mit cis-Platin-Komplexen, beispielsweise cis-Diamino-dichloro-Platin, oder mit Adriamycin, Cyclophosphamid, Vincristin, Tamoxifen, Methotrexat oder 5-Fluorouracil, etc.

Bei der Anwendung der Kombinationstherapie ist es möglich, die Wirkstoffe in einer sogenannten fixen Kombination, d. h. in einer einzigen pharmazeutischen Formulierung zu verabreichen, in der beide Wirkstoffe gleichzeitig vorhanden sind, oder eine sog. freie Kombination zu wählen, bei der die Wirkstoffe in Form von pharmazeutischen Formulierungen gleichzeitig oder aber auch nacheinander appliziert werden.

Zur Herstellung pharmazeutischer Mittel wird Imexon in an sich bekannter Weise mit geeigneten pharmazeutischen Trägersubstanzen gemischt, gegebenenfalls granuliert und beispielsweise zu Tabletten oder Drageekernen verpreßt. Ebenso ist eine Abfüllung der Mischung in Stekkapseln möglich. Unter Zugabe entsprechender Hilfsstoffe kann auch eine Lösung oder Suspension in Wasser, Öl (z. B. Olivenöl) oder hochmolekularen Polymeren (z. B. Polyethylenglykol) hergestellt und zu Injektionslösungen, Weichgelatinekapselfn, Saft oder Tropfen verabreicht werden.

Als feste Trägerstoffe können z. B. Stärken bzw. Stärkederivate, Zucker, Zuckeralkohole, Cellulosen bzw. Cellulosederivate, Tenside, Talkum, hochdisperse Kieselsäuren, hochmolekulare Fettsäuren oder deren Salze, Gelatine, Agar-Agar, Kalziumphosphat, tierische oder pflanzliche Fette oder Wachse und feste hochmolekulare Polymere (wie Polyethylenglykole oder Polyvinylpyrrolidone) Verwendung finden. Für orale Applikationen geeignete Zubereitungen können gewünschtenfalls Geschmacks- und Süßstoffe enthalten.

Die Dosierung des Wirkstoffes Imexon hängt vom Alter und Geschlecht des Individuums sowie von der Art der zu behandelnden Indikation ab.

Grundsätzlich kann davon ausgegangen werden, daß 0,1—100 mg Imexon pro kg Körpergewicht täglich oral, intravenös, subkutan oder intramuskulär appliziert werden können. Bevorzugt sind jedoch Mengen von 5—50 mg/kg Körpergewicht, insbesondere 5—20 mg/kg. Die Wirkstoffmengen können 1- bis 3mal täglich verabreicht werden.

Die spezifisch immunsuppressive Wirkung von Imexon wird anhand der folgenden Beispiele belegt:

Beispiel 1

BCGF-abhängige Proliferation humaner B-Lymphozyten

Die Anreicherung von peripheren humanen B-Zellen und der BCGF-Proliferationsassay wurden wie folgt durchgeführt (vgl. a. Eur. J. Immun. 16, 350 [1986]):

Angereicherte humane B-Lymphozyten werden zweimal gewaschen mit komplettiertem RPMI 1640 Medium (Streptomycin/Penicillin, L-Glutamin, 2-Mercaptoethanol, FCS) und auf 3×10^5 Zellen/ml eingestellt. 160 ml dieser Suspension werden jeweils pro Well in Mikrotiterplatten pipettiert. Als Pseudoantigen werden 10 ml einer Lösung von HFC μ S-IgG (300 μ g/ml) zugegeben und als Wachstumsfaktor 20 μ l BCGF HFC μ S-IgG (Cellular Products Incorporation) hinzugefügt. Dazu werden 20 μ l der zu testenden Verbindung in 10facher Konzentration pipettiert. Die Kulturen werden insgesamt 140 h bei 37°, 5% CO $_2$ und 95% relativen Luftfeuchtigkeit inkubiert. 16 h vor Ablauf der Inkubationszeit wird jede Kultur mit 1 μ Ci einer [3 H]-Thymidin-Lösung gepulst. Am Ende des Versuches werden die Zellen mit einem Harvester geerntet und die eingebaute Radioakti-

vität in einem Flüssigszintillationszähler bestimmt.

Beispiel 2

Concanavalin A (ConA)-induzierte Proliferation muriner Splenozyten

Milzzellen (4×10^5) von CB6F₁-Mäusen werden mit 0,5 µg/ml ConA in Mikrotiterplatten (Nunc GmbH, Wiesbaden, FRG) und verschiedenen Konzentrationen von Imexon in 6fach-Ansätzen für insgesamt 48 h inkubiert. 5 h vor Ablauf der Inkubationszeit werden die Kulturen mit [³H]-Thymidin gepulst und anschließend auf Glasfiterfilterplättchen mittels eines Multisample Harvester (Skatron A.S., Lier, Norwegen) geerntet. Die Filterplättchen werden getrocknet und die Radioaktivität in einem Packard Szintillationsspektrometer bestimmt.

Beispiel 3

Phytohämagglutinin (PHA)-induzierte Proliferation humaner Lymphozyten

1 ml humanes Vollblut wird mit 500 µg PHA-Lösung (500 µg/ml) und 48 ml DMEM-Medium verdünnt. Jeweils 200 µl dieses Ansatzes werden mit 20 µl der zu testenden Imexonkonzentration in 6fach-Ansätzen gemischt und 4 Tage inkubiert. Nach Pulsen mit [³H]-Thymidin wird weitere 24 h inkubiert, geerntet und ausgewertet, wie bei Beispiel 2 beschrieben.

Beispiel 4

Tumorstwachstumsinhibitionsassay (TGI)

Die Methylcholanthren-induzierte Fibrosarkomzelllinie (MethA) wurde aus der eigenen Tumorzellbank erhalten und intraperitoneal in CB6F₁-Mäusen passagiert.

1×10^4 MethA-Zellen werden mit der zu testenden Imexonkonzentration in DMEM-Medium über 48 h inkubiert. 3 h vor Ablauf der Inkubationszeit wird mit [³H]-Thymidin gepulst, geerntet und ausgewertet, wie bei Beispiel 2 beschrieben.

Die in der Tabelle angegebenen Werte zeigen das Ergebnis eines repräsentativen Experimentes. Es sind die Ergebnisse der Untersuchungen mit Imexon im TGI-, LTT (ConA, PHA)- sowie im BCGF-Assay, d. h. der Einfluß von Imexon auf die MethA-Sarkomzell-, Lymphozyten- und B-Zell-Proliferation, dargestellt. Imexon supprimiert signifikant und spezifisch die BCGF-induzierte B-Zellproliferation bei einer Konzentration von 1 µg/ml, wohingegen die Lymphozytenproliferation, induziert entweder durch ConA oder PHA, erst bei Konzentrationen > 10 µg/ml signifikant gehemmt werden. Ferner ist die Spontanproliferation von MethA-Sarkomzellen ebenfalls erst ab > 10 µg/ml signifikant unterdrückt.

Die Ergebnisse der obigen Versuche sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

Tabelle
Effekt von Imexon auf die Proliferation verschiedener Zelltypen

Imexon ($\mu\text{g/ml}$)	TGI (MethA)		% Hemmung	LTT (Splenocyten, ConA)		% Hemmung	LTT (humane Lymphocyten, PHA)		% Hemmung	BOGF (humane B-Lymphocyten)	
	$^3\text{H-TdR}$ cpm (n=6)	SD		$^3\text{H-TdR}$ cpm (n=6)	SD		$^3\text{H-TdR}$ cpm (n=6)	SD		$^3\text{H-TdR}$ cpm (n=6)	% Hemmung
Kontrolle	33 966 (n=5)	3000	-	109 879	12 203	-	44 283	6 458	-	5541	1792
100	534	363	98**	903	62	99**	585	44	99**	562	44
30	911	110	97**	2 509	863	98**	573	59	99**	617	59
10	21 913	2357	35**	24 895	6 563	77**	4 724	704	89**	574	50
3	35 473	3135	-4	118 487	9 494	-8	35 850	13 018	19	831	231
1	35 475	1753	-4	119 120	9 172	-8	49 348	4 168	-11	2096	455
0,3	37 593	3080	-11	134 032	37 682	-22	45 542	9 870	-3	4201	1636
0,1	31 722	3991	7	109 717	11 192	0	41 849	1 892	5	4847	1146

* $p < 0.002$ ** $p < 0.001$

Beispiel 5

Herstellung einer pharmazeutischen Formulierung von Imexon

Als besonders geeignete Arzneimittelzubereitung hat sich eine Filmtablette mit 100 mg Wirkstoff erwiesen, die wie folgt zusammengesetzt ist:

	Gewicht/Stück/mg
Imexon	100 000
Lactose · 1 H ₂ O	63 000
Poly (O-carboxymethyl)stärke, Na-Salz	7 000
Poly (1-vinyl-2-pyrrolidon) 25 000	4 000
Poly (O-carboxymethyl)stärke, Na-Salz	3 000
Mikrokristalline Cellulose	20 000
Siliciumdioxid, hochdispers	1 500
Magnesiumstearat	1 500
Kerngewicht:	200 000

Die Filmtabletten werden dann durch Filmdragierung der erhaltenen Imexonkerne in üblicher Weise hergestellt.

Filmtabletten mit z. B. 10 mg, 50 mg, 200 mg oder 500 mg Wirkstoff werden in entsprechender Weise hergestellt.

Patentansprüche

1. Verwendung von Imexon zur Behandlung von viralen oder retroviren Infektionen.
2. Verwendung von Imexon zur Prophylaxe oder Behandlung von AIDS oder ARC.
3. Verwendung gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirkstoff Imexon neben üblichen pharmazeutischen Hilfsstoffen in Form von Tabletten verabreicht wird und der Wirkstoff in einer Menge von 10—1000 mg pro Tablette enthalten ist.
4. Arzneimittel enthaltend Imexon in Kombination mit antiretroviral aktiven Wirkstoffen.
5. Arzneimittel gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der antiretroviral aktive Wirkstoff Azidotymidin (AZT) ist.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

ORIGINATOR - DC 20440554 1 -

Abb. 1

